

# Infección de callo embriogénico friable de yuca con *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* (*Xam*)

## Cassava friable embryogenic calli infection with *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* (*Xam*)

Paula Díaz Tatis<sup>\*</sup>, Carlos Andrés Zárate<sup>\*\*</sup>, Adriana Bernal Giraldo<sup>\*\*\*</sup>,  
Camilo López Carrascal<sup>\*\*\*\*</sup>

DOI: 10.15446/rev.colomb.biote.v18n2.61523

### Resumen

Las nuevas tecnologías para la edición de genomas, como los TALEN y el sistema CRISPR/Cas9, representan una gran oportunidad para mejorar características deseables en diferentes organismos. Los TALEN son el resultado del acoplamiento de nucleasas a los TALE (*Transcription Activator-Like Effectors*), los cuales son efectores naturales de gran importancia en la patogénesis de las especies de *Xanthomonas*. *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* (*Xam*) es el agente causal del añublo bacteriano de la yuca, quien durante el proceso patogénico es capaz de translocar sus efectores a la célula vegetal mediante el sistema de secreción tipo tres (SSTT). Actualmente no hay protocolos estándar para la edición de genomas en yuca. En este estudio se exploró la posibilidad de translocar efectores sobre callo embriogénico friable (CEF) a través de la inoculación con *Xam*, con el fin de determinar el potencial de este patógeno como sistema de entrega de TALEN. El CEF de dos variedades de yuca susceptibles (COL2215 y cv. 60444) se cocultivaron con la cepa *Xam668* a diferentes tiempos. Posteriormente, se evaluó la expresión de marcadores correspondientes a los genes blanco conocidos para los TALE presentes en esta cepa bacteriana. Aunque no se logró demostrar la translocación de los mismos en el tejido embriogénico, sí se lograron establecer condiciones adecuadas de cultivo con *Xam* y el efecto que la infección bacteriana tiene sobre la regeneración de embriones a partir de este tejido.

**Palabras clave:** cultivo de tejidos vegetales, edición de genomas, sistema de secreción tipo tres, efectores TALE, transformación.

### Abstract

New technologies for genome edition, such as TALENs and CRISPR/Cas9 system, are a great opportunity to improve desirable features in different organisms. TALENs are the result from coupling nucleases and TALEs (*Transcription Activator-Like Effectors*), which are natural effectors with an important role in pathogenicity for the *Xanthomonas* species. *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* (*Xam*) is the cassava bacterial blight causal agent, and this pathogen is able to translocate its effectors to the plant cell during pathogenesis by using the type-three secretion system (TTSS). Currently, there are no standard protocols for genome edition in cassava. In this study, we explored the possibility to translocate effectors to friable embryogenic calli (FEC) through *Xam* inoculation, in order to establish the potential of this pathogen as a TALEN delivery system. Friable embryogenic calli derived from two different susceptible varieties (COL2215 and cv. 60444) were co-cultured with the strain *Xam668* using different culture times. Subsequently, we evaluated the expression of makers corresponding to reported target genes for TALEs present in this bacterial strain. Although we were not able to demonstrate effector translocation, we established the conditions for co-culturing cassava calli and *Xam* and determined the effects derived from bacterial infection on embryo regeneration from FECs.

**Key words:** genome edition, plant tissue culture, TALEs, transformation, type-three secretion system.

**Recibido:** agosto 3 de 2016

**Aprobado:** noviembre 8 de 2016

\* Manihot biotec, Departamento de Biología de la Universidad Nacional de Colombia. Sede Bogotá, padiazta@unal.edu.co

\*, \*\* Laboratorio de Micología y Fitopatología de la Universidad de los Andes. ca.zarate10@uniandes.edu.co

\*\*\* Laboratorio de Micología y Fitopatología de la Universidad de los Andes. abernal@uniandes.edu.co

\*\*\*\* Manihot biotec, Departamento de Biología de la Universidad Nacional de Colombia. Sede Bogotá, celopezc@unal.edu.co

## Introducción

La modificación de la información genómica representa una posibilidad con grandes implicaciones ya que permitiría borrar, incorporar o potenciar características deseadas en los diferentes organismos. Clásicamente, la edición de genomas se ha realizado mediante el uso de ADN nucleasas como FokI, cuyo dominio endonucleasa inespecífico corta la doble cadena del ADN cuando se dimeriza (Durai *et al.*, 2005; Carroll, 2008; Carroll, 2011). Tales rupturas en la doble cadena (Double Strand Broken, DSB) son luego reparadas por el sistema de reparación de la célula de tipo unión de extremos no homólogos (Non Homologous End Joining, NHEJ) (Lieber *et al.*, 2009). Para lograr la especificidad en la edición de una región particular de ADN se debe fusionar FokI con una proteína que sea capaz de reconocer una secuencia de ADN específica (Bibikova *et al.*, 2002; Bibikova, 2003). Clásicamente, esto se ha logrado empleando las proteínas que poseen dominios dedos de cinc (Carroll, 2008; Carroll, 2011). Aunque útil, este sistema ha mostrado adolecer de problemas como la baja especificidad e ineficiencia (Park *et al.*, 2016).

Las bacterias Gram negativas fitopatógenas han evolucionado un sistema especializado de inyección de proteínas conocido como sistema de secreción tipo tres (SSTT) que permite el envío de proteínas efectoras al interior de la célula vegetal (Block *et al.*, 2008; Tampakaki *et al.*, 2010). Entre las proteínas efectoras se destacan los TALE, los cuales están presentes en las fitobacterias del género *Xanthomonas*. Estos efectores modifican la expresión de genes del hospedero a través de la represión de la respuesta de defensa y/o la activación de genes en beneficio de las bacterias (Boch *et al.*, 2014). Su topología típica consta de una región N-terminal, la cual posee una señal responsable de la translocación de la proteína a través del SSTT, una región C-terminal, donde se encuentran dos señales de localización nuclear (SLN) y un dominio de activación transcripcional ácido, y una región central, la cual está compuesta por una serie de repeticiones casi idénticas de 33 a 35 aminoácidos (Bogdanove *et al.*, 2010; Scholze y Boch, 2011). Dentro de cada una de estas repeticiones, las posiciones de los aminoácidos 12 y 13 presentan la mayor variabilidad. Recientemente se estableció que estos dos aminoácidos determinan la especificidad por la secuencia de ADN a la cual se une el efector, a manera de un código. Estas dos posiciones se denominan RVD (Repeat Variable Di-residue) (Boch *et al.*, 2009). El número de repeticiones determina el largo de la secuencia de nucleótidos a la que se une la proteína sobre el ADN. De esta forma, conociendo el número de repeticiones y los aminoácidos de las posiciones 12 y 13 de cada bloque es posible determinar la secuencia de nucleótidos a la cual se unirá el efector.

Recientemente, con el descubrimiento del código de los TALE, ha sido posible construir módulos de repe-

tes, cuyas secuencias confieran especificidad de unión al efector hacia una secuencia de ADN en particular (Geißler *et al.*, 2011). Estos efectores han sido fusionados al dominio endonucleasa inespecífico de FokI produciendo las así llamadas proteínas TALEN (TALE nucleasas) (Li *et al.*, 2010; Miller *et al.*, 2010). Este sistema ha mostrado ser altamente eficiente y específico para la edición de genomas de un amplio grupo de organismos, el cual incluye plantas (Sander *et al.*, 2011; Tesson *et al.*, 2011; Lei *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2012; Cheng *et al.*, 2013). Sin embargo, la edición con TALEN en plantas solo se logra mediante transformación genética utilizando *Agrobacterium*, pasando por un proceso de generación de organismos genéticamente modificados (OGM), lo que conlleva un problema de aceptación pública.

Dentro de los cultivos que pueden ser objeto de la tecnología de edición de genomas se destaca la yuca, la cual es uno de los principales productos para la seguridad alimentaria mundial. La yuca representa una de las mayores fuentes de calorías para más de 1000 millones de personas en el mundo, principalmente de las regiones tropicales (Taylor *et al.*, 2012). El mejoramiento tradicional de yuca si bien ha logrado generar variedades con características deseadas, es un proceso largo. El desarrollo de estrategias biotecnológicas alternativas, tales como la edición del genoma, permitiría desarrollar variedades mejoradas para rasgos de interés de manera más rápida. La producción de yuca puede verse afectada por varias enfermedades, dentro de las cuales la bacteriosis vascular o añublo bacteriano, ocasionado por *Xam*, es una de las más limitantes. La bacteriosis se presenta en todas las regiones donde se cultiva la yuca (López & Bernal, 2012; FAO, 2013). Los estudios sobre el genoma de diferentes cepas de *Xam* (Bart *et al.*, 2012; Arrieta-Ortiz *et al.*, 2013) han permitido identificar la presencia de un TALE, denominado TALE1*Xam*, el cual es responsable en gran medida de la virulencia de *Xam* (Castiblanco *et al.*, 2012). Mediante análisis de transcriptoma se pudo demostrar que el TAL20<sub>*Xam668*</sub> es capaz de activar la transcripción de un transportador de sacarosa en las células de yuca (*MeSweet10a*), cuya sobreexpresión es crítica para la formación de lesiones durante el proceso patológico (Cohn *et al.*, 2014).

La presencia de los TALE en *Xam* plantea la posibilidad de que esta bacteria sea capaz de liberar al interior de las células de yuca TALEN dirigidos a secuencias de ADN genómico de manera específica para su posible edición. Esta estrategia aliviaría las controversias sobre el empleo de plantas transgénicas y su aceptación social. En este estudio se evaluó a manera de prueba de concepto la posibilidad de que *Xam* pueda liberar naturalmente TALE a células de yuca de CEF, tejido que se utiliza normalmente para la regeneración de plantas. Para ello, en primera medida se evaluó la capacidad de infección de CEF por parte de *Xanthomonas* y posteriormente se evaluó la expresión de genes blanco

de TALEs como una medida de la liberación de TALEs dentro de las células de CEF.

## Materiales y métodos

### Material vegetal

Plantas de yuca *in vitro* de las variedades COL2215 y cv. 60444 fueron obtenidas del Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia. Las plantas se multiplicaron en medio basal Murashige y Skoog (MS) (Murashige & Skoog, 1962) como ha sido descrito previamente (Bull *et al.*, 2009; Taylor *et al.*, 2012). El CEF se generó mediante la metodología previamente descrita (Taylor *et al.*, 1996; Bull *et al.*, 2009). Brevemente, se tomaron plantas *in vitro* de cuatro semanas, se indujo el desarrollo de yemas axilares para la obtención de estructuras embriogénicas organizadas (EEO). Estas estructuras se cultivaron en medio MS suplementado con picloram 50  $\mu$ M durante tres semanas, posteriormente se realizaron cortes sobre las mismas con un bisturí y se transfirieron a medio basal Greshoff y Doy (GD) (Gresshoff & Doy, 1972) suplementado con picloram 50  $\mu$ M para inducir la formación de CEF. El tejido se subcultivó en el mismo medio cada tres semanas hasta su inoculación.

### Inoculación del CEF y regeneración

La evaluación del efecto de carbenicilina y cefotaxima sobre el crecimiento de *Xam* se realizó en medio LPGA (5 g/L extracto de levadura, 5 g/L glucosa, 5 g/L peptona y 15 g/L agar) suplementado con cada uno de los antibióticos a las siguientes concentraciones: carbenicilina 100 mg/L (car100) y 200 mg/L (car200), cefotaxima 500 mg/L (cefo500) y 1000 mg/L (cefo1000). Se emplearon tres réplicas por tratamiento con el respectivo antibiótico. Posteriormente se incubaron las respectivas cajas de Petri a 28 °C durante 48 h.

Para la infección del CEF se empleó la cepa *Xam668*, para la cual se han descrito y validado experimen-

talmente genes blanco de TAL20<sub>*Xam668*</sub> y TAL14<sub>*Xam668*</sub> (Cohn *et al.*, 2014; Cohn *et al.*, 2016). Inicialmente, la bacteria se aisló en medio LPGA a partir del banco de conservación. La bacteria se incubó durante dos días a 28 °C y, posteriormente, a partir de una colonia aislada, se inoculó caldo LPG (5 g/L extracto de levadura, 5 g/L glucosa y 5 g/L peptona). El cultivo se incubó durante 24 h a 28 °C y 250 rpm, posteriormente se centrifugó durante 15 min a 4000 rpm y se realizaron dos lavados sucesivos del pellet con MgCl<sub>2</sub> 10 mM. La concentración de la suspensión bacteriana se ajustó a una DO<sub>600nm</sub> = 0,7. Se inocularon 4 clústeres de CEF por tratamiento (cada clúster con un área aproximada de 30 mm<sup>2</sup>). Cada clúster se inoculó con 80  $\mu$ L de la suspensión bacteriana y se realizó un cocultivo con *Xam* durante 12, 24, 36, 48 y 72 h en medio básico de sales GD suplementado con picloram 50  $\mu$ M. El cocultivo se mantuvo a 28 °C con fotoperiodo (12 h/12 h luz/oscuridad). Como control se empleó MgCl<sub>2</sub> 10 mM. Después de cada cocultivo, se colocaron tres clústeres de CEF en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C para la posterior extracción de ARN. Con el fin de evaluar la regeneración de embriones, el clúster restante se cultivó en medio de organogénesis de yuca (COM) (sales MS, 20 g/L sacarosa, 1 mg/L BAP, 0,5 mg/L IBA, 2  $\mu$ M CuSO<sub>4</sub>) (Li *et al.*, 1996) suplementado con cefotaxima 500 mg/L.

### Extracción de ARN y síntesis de ADNc

El tejido proveniente de los tres clústeres de CEF se maceró en nitrógeno líquido y se realizó la extracción de ARN con 100 mg de tejido. Para esto se empleó el kit Invitrap® Spin plant RNA (STRATEC, Berlín, GER). El tratamiento con DNaseI (ThermoScientific, Waltham, MA, USA) se realizó sobre 1  $\mu$ g de ARN total. La ausencia de contaminación con ADN genómico se verificó mediante PCR con iniciadores de  $\beta$ -tubulina (tabla 1). La síntesis de ADNc se llevó a cabo empleando el First Strand cDNA Synthesis Kit (ThermoScientific, Waltham, MA, USA).

**Tabla 1.** Juego de iniciadores empleados en los ensayos de RT-PCR

Iniciador	Secuencia (5´-3´)	Tamaño amplicón (pb)	ID gen	Descripción
007598_F	GGAAAGATGAGCACCAAGGA	230	cassava4.1_007598 Manes.08G061700	$\beta$ -tubulina
007598_R	ACCAGTATACCAGTGCAAGAAG			
013474_F	CCAAACACATTGGGCTTTCT	244	cassava4.1_013474 Manes.06G123400	MeSweet10a, blanco de TAL20 <sub><i>Xam668</i></sub>
013474_R	CAATGTCCTGCTCGGTTTCT			
007568_F	TGACAAAGAGGGTGGAACA	193	cassava4.1_007568 Manes.03G152600	Pectato liasa, blanco de TAL14 <sub><i>Xam668</i></sub>
007568_R	AGAGCACCTGCGTTAGCAGT			

### PCR sobre ADNc y ADN genómico

Para la reacción de amplificación se utilizó la DreamTaq™ DNA polymerase (ThermoScientific, Waltham, MA, USA). El volumen final de cada reacción fue de 10 µL (20 nM de iniciadores, 40 nM de mezcla de dNTPs, 0,25 U de DreamTaq™ DNA polymerase, 1X DreamTaq™ buffer con MgCl<sub>2</sub>). Se agregaron 2 µL del ADNc (obtenido como se describió previamente), 50 ng de ADN genómico para el control positivo o agua ultrapura para el control negativo. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: denaturación inicial a 95 °C durante 3 min, seguida de 30 ciclos de amplificación (denaturación a 95 °C durante 30 segundos, anillamiento a 52 °C durante 30 segundos, extensión a 72 °C durante 30 segundos), seguidos de una extensión final a 72 °C durante 10 min y una incubación final a 20 °C durante 10 min. Los sets de primers empleados se muestran en la tabla 1. Los resultados de las reacciones de PCR se evidenciaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.2%.

## Resultados

### Infeción de CEF con *Xam* y cocultivo

Con el fin de evaluar la capacidad de *Xam* para infectar e inyectar TALE en tejido embriogénico de yuca, se inocularon CEF obtenidos de las variedades susceptibles cv. 60444 y COL2215 con *Xam668*. Se empleó esta cepa de *Xam* ya que los blancos de dos de sus efectores, TAL20<sub>*Xam668*</sub> y TAL14<sub>*Xam668*</sub>, han sido reportados y validados experimentalmente (Cohn *et al.*, 2014; Cohn *et al.*, 2016).

Dado que no se cuenta con información previa sobre la cinética de infección de *Xam* en el CEF de yuca, se decidió evaluar distintos tiempos de cocultivo entre 12 y 72 h. En el CEF cocultivado durante 48 y 72 h con *Xam668* se observó un ligero crecimiento bacteriano

a manera de corona alrededor del CEF. Esto no se observó para el CEF cocultivado durante 12, 24 y 36 h (tabla 2).

### Selección de antibiótico para CEF inoculado con *Xam*

Una vez el CEF se infecta con *Xam*, es necesario eliminar la bacteria antes de continuar con el proceso de regeneración de las plantas. Con el fin de evaluar el efecto de dos antibióticos sobre el crecimiento de *Xam*, la cepa *Xam668* se cultivó en medio suplementado con carbenicilina y se evaluaron dos concentraciones: 100 mg/L (Car100) y 200 mg/L (Car200). De la misma manera, se evaluó el crecimiento de *Xam668* en medio suplementado con dos concentraciones de cefotaxima, 500 mg/L (Cefo500) y 1000 mg/L (Cefo1000). Estos antibióticos y sus respectivas concentraciones se seleccionaron teniendo en cuenta reportes previos del control bacteriano sobre *Agrobacterium tumefaciens* luego del cocultivo y la regeneración de embriones en yuca (Hankoua *et al.*, 2006; Taylor *et al.*, 2012). Después de 48 h de incubación, se observó crecimiento de *Xam668* en el medio suplementado con Car100, pero no en Car200. Por otro lado, las dos concentraciones de cefotaxima evaluadas (Cefo500 y Cefo1000) inhibieron el crecimiento de *Xam*. Dado que en nuestro laboratorio se ha empleado de manera exitosa cefotaxima para restringir el crecimiento de *A. tumefaciens* después del cocultivo del CEF, se decidió emplear este mismo antibiótico para controlar el crecimiento de *Xam* en el tejido embriogénico durante la regeneración.

### Regeneración de embriones infectados con *Xam*

Con el objeto de examinar la regeneración de embriones a partir de CEF inoculado con *Xam*, se transfirió el CEF a medio de organogénesis de yuca (COM) y se mantuvo en observación continua para evaluar la

**Tabla 2.** Tabla resumen del experimento de inoculación de CEF con *Xam668*. -<sup>c</sup>, contaminación ambiental; -, ningún crecimiento; +, crecimiento leve; ++, crecimiento moderado; +++, crecimiento abundante; +++++, sobre-crecimiento en toda la placa.

Tratamiento	Cultivar	Tiempo cocultivo (h)	Crecimiento de <i>Xam</i> en cocultivo	Regeneración de embriones	Reactivación de <i>Xam</i>
<i>Xam668</i>	cv. 60444	12	-	No	-
<i>Xam668</i>	cv. 60444	36	-	- <sup>c</sup>	- <sup>c</sup>
<i>Xam668</i>	cv. 60444	72	+	No	+
MgCl <sub>2</sub>	cv. 60444	72	-	No	-
<i>Xam668</i>	COL2215	24	-	Sí	++++
<i>Xam668</i>	COL2215	48	+	No	++
<i>Xam668</i>	COL2215	72	+	No	+++
MgCl <sub>2</sub>	COL2215	72	-	No	-

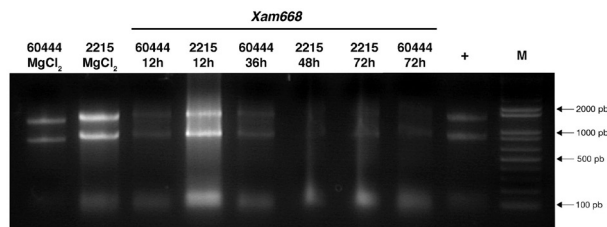
proliferación de embriones. Después de un mes se observó la regeneración de embriones en el tejido embriogénico proveniente de COL2215 cocultivado con *Xam* durante 24 h. En los demás tratamientos no se logró detectar el desarrollo de embriones, incluyendo el CEF tratado con la solución del control con MgCl<sub>2</sub> (tabla 2). El hecho de no haber observado desarrollo de embriones en los otros tratamientos, incluyendo los controles, está relacionado con la baja eficiencia del mismo para producir embriones luego de varios pases de cultivo en medio GD.

Por otro lado, se observó una reactivación del crecimiento de *Xam* para el material cocultivado durante 24, 48 y 72 h con *Xam668* (tabla 2). Es posible que después de cuatro semanas de cultivo en medio de regeneración, el antibiótico pierda su estabilidad en el medio, explicando así la reactivación de *Xam* para ambos genotipos. La reactivación del crecimiento de *Xam* fue más notoria en el cocultivo de 24 h con el CEF del cultivar COL2215. De manera interesante, la reactivación de *Xam* en este tratamiento no afectó negativamente la producción de embriones (tabla 2, cocultivo de 24 h del cultivar COL2215). Estos resultados sugieren que la activación del crecimiento de *Xam* podría ser dependiente del cultivar, ya que en el tejido embriogénico de cv.60444 cocultivado con *Xam* durante 72 h, el crecimiento de *Xam* fue mucho menor comparado con el tejido embriogénico de COL2215.

### Expresión de genes inducidos por dos TALE de *Xam668* en CEF

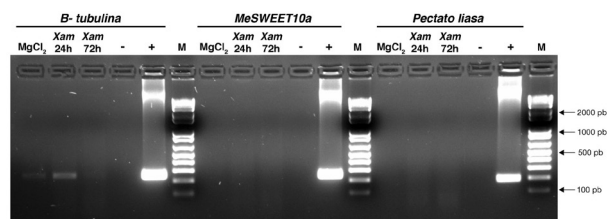
Estudios previos han mostrado que la cepa *Xam668* es capaz de inducir la expresión de genes en yuca con el fin de promover su patogenicidad. Dentro de estos genes blanco se destacan cassava4.1\_013474 (*MeSweet10a*) inducido por el TAL20<sub>*Xam668*</sub> y cassava4.1\_007568 (*pectato liasa*) inducido por el TAL14<sub>*Xam668*</sub> (Cohn et al., 2014), los cuales han sido validados experimentalmente. Con el fin de evaluar la capacidad de *Xam668* para inyectar sus TALE a CEF de yuca e inducir la expresión de los genes blanco, se evaluó la expresión de los genes *MeSweet10a* y *pectato liasa*.

A partir del CEF de yuca infectado con *Xam668* (tabla 2), se realizó la extracción de ARN y síntesis de ADNC. En la figura 1 se muestran los resultados de la extracción, en donde se observa la presencia de un ARN total de buena calidad en la mayoría de las muestras. Como control de la extracción se empleó tejido vegetal de tallos de yuca, procedimiento que está estandarizado en nuestros laboratorios. Se encontró que el ARN obtenido a partir del tejido embriogénico cocultivado con *Xam* durante 48 y 72 h es de menor calidad y concentración en comparación con el tejido embriogénico tratado con MgCl<sub>2</sub> (control). Esto sugiere que el crecimiento de *Xam* en el CEF interfiere de alguna forma con la obtención de ARN total.



**Figura 1.** Extracción de ARN de CEF inoculado con *Xam668* a diferentes tiempos de cocultivo (12, 24, 36, 48 y 72 horas). El ARN de una muestra de tallo se empleó como control positivo (+) de la extracción. M: marcador de peso, 1Kb plus (ThermoScientific, Waltham, MA, USA).

A partir del ARN obtenido se llevó a cabo la síntesis de ADNC de cada una de las muestras. Como control de gen de referencia se emplearon iniciadores que permiten amplificar un producto de 230 pb del último exón del gen que codifica para la  $\beta$ -tubulina (tabla 1). Una vez sintetizada la primera cadena de ADNC se procedió a realizar una PCR para corroborar la correcta síntesis, utilizando los iniciadores de  $\beta$ -tubulina. Debido a la baja calidad de los ARN obtenidos no se observó amplificación del gen de referencia en algunas muestras (cv. 60444 cocultivo de 36 h y 72 h). Teniendo en cuenta lo anterior, se decidió evaluar la expresión por RT-PCR de solo las muestras en las que se detectó el amplicón del gen de referencia (COL2215 control con MgCl<sub>2</sub>, cocultivo de 24 h y 72 h con *Xam668*). En la figura 2 se muestran los niveles de expresión para el gen de referencia ( $\beta$ -tubulina), *MeSweet10a* y *pectato liasa* a 25 ciclos de amplificación. Se observa que no hay expresión del gen *MeSweet10a* ni de la *pectato liasa*, en ninguna de las muestras evaluadas. Esto sugiere que la inoculación del CEF con *Xam668* no indujo la expresión de genes blanco de TAL20<sub>*Xam668*</sub>. Con el fin de corroborar esto, se decidió repetir la PCR a 35 ciclos (figura 3). Estos resultados muestran que el



**Figura 2.** RT-PCR de los genes blanco (*MeSWEET10a*, *pectato liasa*) de dos TALE de *Xam668* (TAL20<sub>*Xam668*</sub> y TAL14<sub>*Xam668*</sub>) en CEF de yuca. Se realizaron 25 ciclos de amplificación para la evaluación de los tres genes. El CEF inoculado con MgCl<sub>2</sub> se empleó como control negativo de la inoculación. El control negativo (-) y positivo (+) de la reacción de PCR corresponden a agua y ADN genómico, respectivamente. M: marcador de peso, 1Kb plus (ThermoScientific, Waltham, MA, USA).

gen *MeSweet10a* no se encuentra inducido en CEF de yuca, después de la inoculación con *Xam668*. De manera similar, el gen que codifica para una *pectato liasa* (*Manes.03G152600*) parece estar reprimido a 24 y 72 h después del cocultivo con *Xam668* (figura 3).

## Discusión

Recientemente, ha aumentado de manera exponencial el número de estudios encaminados hacia la edición genómica. Sin embargo, en yuca aún no existen reportes sobre edición genómica mediada por la tecnología de TALEN o CRISPR/Cas9. En este trabajo se realizó una primera aproximación para evaluar la capacidad de *Xam668* para inyectar efectores que modulen la expresión de genes en el CEF, tejido embrionario de yuca ampliamente usado en transformación genética. Para esto se cocultivaron CEF provenientes de dos variedades susceptibles de yuca (COL2215 y cv. 60444) con la cepa patógena *Xam668* y se evaluó la inducción de la expresión de los genes blanco de TAL20<sub>*Xam668*</sub> y TAL14<sub>*Xam668*</sub>. Nuestros resultados muestran que la bacteria puede proliferar sobre el tejido embrionario y que en algunos casos el tejido embrionario infectado con *Xam* permite la regeneración. Sin embargo, se determinó que *Xam668* no es capaz de inyectar sus TALE al interior del CEF de yuca, ya que no se observó la inducción de *MeSweet10a* ni de *pectato liasa*, los cuales son los genes blanco de TAL20<sub>*Xam668*</sub> y TAL14<sub>*Xam668*</sub>, respectivamente. El gen *MeSweet10a* codifica para un transportador de azúcar y se ha propuesto que la inducción de este gen conduce a la movilización de glucosa y sacarosa desde el interior de la célula vegetal al apoplasto, para así favorecer el crecimiento bacteriano. Sin embargo, en yuca la presencia de TAL20<sub>*Xam668*</sub> no se relacionó con el crecimiento de *Xam* en la hoja (Chen *et al.*, 2010; Cohn *et al.*, 2014). Por otro lado, se cree que la *pectato liasa* podría estar involucrada en los procesos de colonización en tejidos vasculares y foliares, aunque esto no se ha comprobado experimentalmente.

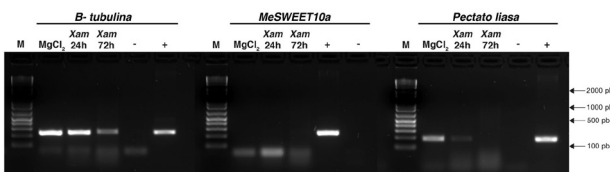
Una posible explicación para la falta de activación de la expresión de genes blanco de TAL20<sub>*Xam668*</sub> podría ser

la falta de inducción del SSTT de *Xam* en el CEF de yuca. Se sabe que el envío de efectores está condicionado por varios factores ambientales en el apoplasto de la planta. Una vez que las bacterias fitopatógenas perciben las condiciones ambientales del apoplasto (pH bajo, baja presión osmótica, etc.) inducen la formación del pilus Hrp (Hypersensitive Response and Pathogenicity) (Wei *et al.*, 1992; Tang *et al.*, 2006) y es a través de este pilus que las proteínas efectoras viajan hacia el interior de la célula vegetal. Es posible que *Xam*, al no encontrarse en el apoplasto vegetal, no logre inducir la formación del pilus Hrp y, por lo tanto, no se trasfieran sus efectores al interior de las células vegetales. Se sabe que las células que conforman el CEF son células pequeñas, multivacuoladas y que presentan una pared celular muy delgada (Taylor *et al.*, 1996). Además, este tejido carece de gránulos de almidón y la concentración de azúcares es distinta a la de otros tejidos (Ma *et al.*, 2015). Esto indica que el tejido vegetal adulto que usualmente es infectado por *Xam* (hojas y tallo) difiere mucho del tejido no diferenciado que conforma el CEF. Adicionalmente, este tejido ha sido subcultivado repetidamente en medios con altas concentraciones de hormonas (auxinas principalmente), por lo tanto, el CEF infectado con *Xam* contiene una carga hormonal mucho más alta que afecta su fisiología (Ma *et al.*, 2015).

Una posible alternativa podría ser cocultivar *Xam* con otros tejidos organogénicos o embrionarios y evaluar la inducción de blancos de los TALE y la regeneración de las plantas. En yuca se han empleado cotiledones somáticos para transformación genética estable, pero con una muy baja eficiencia y un alto número de escapes, razón por la cual el CEF sigue siendo el tejido más exitoso para transformación genética (Li *et al.*, 1996; Taylor *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2011; Taylor *et al.*, 2012).

Otra estrategia, teniendo en cuenta la capacidad de regeneración del CEF, es el empleo de inductores del SSTT en *Xanthomonas* antes del cocultivo con el tejido embrionario. Tanto en *Pseudomonas syringae* como en *Xanthomonas* spp., se han empleado medios mínimos para inducir la expresión de los genes del SSTT y la transferencia de proteínas efectoras (He *et al.*, 1993; Jiang *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2014).

Por otro lado, en este trabajo se evaluó la regeneración de embriones a partir de CEF cocultivado con *Xam*. Se detectó la regeneración de embriones únicamente a partir de CEF con sobrecrecimiento de *Xam*. Esto sugiere que la inoculación con *Xam* no afecta negativamente el desarrollo de embriones a partir de CEF provenientes de la variedad COL2215. En los otros tratamientos no se observó regeneración de embriones, lo cual puede estar relacionado con la edad del tejido empleado en el ensayo. Se ha reportado que el empleo de un CEF con varios pases de cultivo disminuye drásticamente la regeneración de embriones (Taylor *et al.*, 2012).



**Figura 3.** RT-PCR de genes blanco de dos TALE de *Xam668* en CEF de yuca. Se realizaron 35 ciclos de amplificación para la evaluación de los tres genes (*β-tubulina*, *MeSWEET10a*, *pectato liasa*). El CEF inoculado con MgCl<sub>2</sub> se empleó como control negativo de la inoculación. El control negativo (-) y positivo (+) de la reacción de PCR corresponden a agua y ADN genómico, respectivamente. M: marcador de peso, 1Kb plus (ThermoScientific, Waltham, MA, USA).

## Conclusiones

Si bien la estrategia de emplear *Xam* para introducir TALEN con el fin de editar regiones genómicas de yuca resulta atractiva, es un proceso que requiere el ajuste de varias etapas. Este estudio representa un primer esfuerzo por identificar los pasos críticos dentro del proceso. Aunque no se logró demostrar la liberación de los TALE en el CEF, sí se logró establecer las condiciones adecuadas de cocultivo con *Xam* y se determinó el efecto de la infección con esta bacteria sobre la regeneración de embriones a partir de CEF. También se logró establecer estrategias alternativas que permitirían ajustar la metodología con el fin de lograr la introducción de TALE al CEF de yuca. Una vez superadas estas etapas se abrirían importantes posibilidades en la edición genómica de yuca sin necesidad de generar plantas transgénicas.

## Agradecimientos

A la Vicerrectoría Académica de la Universidad Nacional de Colombia, por la Beca de Estudiante Sobresaliente de Posgrado de PADT. A la Facultad de Ciencias de la Universidad de los Andes, por la financiación del proyecto de investigación titulado: Edición de genoma empleando TALEN mediado por *Xanthomonas*: prueba de concepto. A Paul Chavarriaga, del Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), por el apoyo para la generación del callo embriogénico friable. A Ralf Koebnik por la asesoría en el desarrollo del proyecto.

## Referencias bibliográficas

- Arrieta-Ortiz, M.L., Rodríguez-R, L.M., Pérez-Quintero, Á.L., Poulin, L., Díaz, A.C., Arias Rojas, N., Trujillo, C., Restrepo Benavides, M., Bart, R., Boch, J., Boureau, T., Darrasse, A., David, P., Dugé De Bernonville, T., Fontanilla, P., Gagnevin, L., Guérin, F., Jacques, M.-A., Lauber, E., Lefeuvre, P., Medina, C., Medina, E., Montenegro, N., Muñoz Bodnar, A., Noël, L.D., Ortiz Quiñones, J.F., Osorio, D., Pardo, C., Patil, P.B., Poussier, S., Pruvost, O., Robène-Soustrade, I., Ryan, R.P., Tabima, J., Urrego Morales, O.G., Vernière, C., Carrere, S., Verdier, V., Szurek, B., Restrepo, S., López, C., Koebnik, R., & Bernal, A. (2013). Genomic survey of pathogenicity determinants and VNTR markers in the cassava bacterial pathogen *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* strain CIO151. *Plos One*, 8 (11), e79704.
- Bart, R., Cohn, M., Kassen, A., McCallum, E.J., Shybut, M., Petriello, A., Krasileva, K., Dahlbeck, D., Medina, C., Alicai, T., Kumar, L., Moreira, L.M., Neto, J.R., Verdier, V., Santana, M.A., Kositcharoenkul, N., Vanderschuren, H., Gruijssem, W., Bernal, A., & Staskawicz, B.J. (2012). High-throughput genomic sequencing of cassava bacterial blight strains identifies conserved effectors to target for durable resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 109 (29), E1972-1979.
- Bibikova, M. (2003). Enhancing gene targeting with designed zinc finger nucleases. *Science*. 300 (5620): 764.
- Bibikova, M., Golic, M., Golic, K.G., & Carroll, D. (2002). Targeted chromosomal cleavage and mutagenesis in *Drosophila* using zinc-finger nucleases. *Genetics*, 161 (3): 1169-1175.
- Block, A., Li, G., Fu, Z.Q., & Alfano, J.R. (2008). Phytopathogen type III effector weaponry and their plant targets. *Current Opinion in Plant Biology*, 11 (4), 396-403.
- Boch, J., Bonas, U., Lahaye, T. (2014). TAL effectors – pathogen strategies and plant resistance engineering. *New Phytologist*, 204 (4), 823-832.
- Boch, J., Scholze, H., Schornack, S., Landgraf, A., Hahn, S., Kay, S., Lahaye, T., Nickstadt, A., & Bonas, U. (2009). Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. *Science*, 326 (5959), 1509-1512.
- Bogdanove, A.J., Schornack, S., Lahaye, T. (2010). TAL effectors: finding plant genes for disease and defense. *Current Opinion in Plant Biology*, 13 (4), 394-401.
- Bull, S.E., Owiti, J.A., Niklaus, M., Beeching, J.R., Gruijssem, W., & Vanderschuren, H. (2009). *Agrobacterium*-mediated transformation of friable embryogenic calli and regeneration of transgenic cassava. *Nature Protocols*, 4 (2), 1845-1854.
- Carroll, D. (2008). Progress and prospects: Zinc-finger nucleases as gene therapy agents. *Gene Therapy*, 15 (22), 1463-1468.
- Carroll, D. (2011). Genome engineering with zinc-finger nucleases. *Genetics*, 188 (4), 773-782.
- Castiblanco, L.F., Gil, J., Rojas, A., Osorio, D., Gutiérrez, S., Muñoz-Bodnar, A., Pérez-Quintero, A.L., Koebnik, R., Szurek, B., López, C., Restrepo, S., Verdier, V., Bernal, A.J. (2012). TALE1 from *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* acts as a transcriptional activator in plant cells and is important for pathogenicity in cassava plants. *Molecular Plant Pathology*, 14 (1), 84-95.
- Cohn, M., Bart, R.S., Shybut, M., Dahlbeck, D., Gomez, M., Morbitzer, R., Hou, B.-H., Frommer, W.B., Lahaye, T., & Staskawicz, B.J. (2014). *Xanthomonas axonopodis* virulence is promoted by a transcription activator-like effector-mediated induction of a SWEET sugar transporter in cassava. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 27 (11), 1186-1198.
- Cohn, M., Morbitzer, R., Lahaye, T., & Staskawicz, B.J. (2016). Comparison of gene activation by two TAL effectors from *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* reveals candidate host susceptibility genes in cassava. *Molecular Plant Pathology*, 875-889.
- Chen, L.-Q., Hou, B.-H., Lalonde, S., Takanaga, H., Hartung, M.L., Qu, X.-Q., Guo, W.-J., Kim, J.-G., Underwood, W., Chaudhuri, B., Chermak, D., Antony, G., White, F.F., Somerville, S.C., Mudgett, M.B., Frommer, W.B. (2010). Sugar transporters for intercellular exchange and nutrition of pathogens. *Nature*, 468 (7323), 527-532.
- Cheng, Z., Yi, P., Wang, X., Chai, Y., Feng, G., Yang, Y., Liang, X., Zhu, Z., Li, W., Ou, G. (2013). Conditional targeted genome editing using somatically expressed TALENs in *C. elegans*. *Nature Biotechnology*, 31 (10), 934-937.
- Durai, S., Mani, M., Kandavelou, K., Wu, J., Porteus, M.H., Chandrasegaran, S. (2005). Zinc finger nucleases: custom-designed molecular scissors for genome engineering of plant and mammalian cells. *Nucleic Acids Research*, 33 (18), 5978-5990.
- Fao. (2013). *SAVE AND GROW: Cassava, a guide to sustainable production intensification*. Roma, Italia: FAO; p. 129.
- Geißler, R., Scholze, H., Hahn, S., Streubel, J., Bonas, U., Behrens, S.-E., & Boch, J. (2011). Transcriptional activators of human genes with programmable DNA-specificity. *Plos One*, 6 (5), e19509.
- Gresshoff, P.M., & Doy, C.H. (1972). Development and differentiation of haploid *Lycopersicon esculentum* (tomato). *Planta*, 107 (2), 161-170.
- Hankoua, B., Taylor, N., Ng, S., Fawole, I., Puonti-Kaerlas, J., Padmanabhan, C., Yadav, J., Fauquet, C., Dixon, A., & Fondong, V.

- (2006). Production of the first transgenic cassava in Africa via direct shoot organogenesis from friable embryogenic calli and germination of maturing somatic embryos. *African Journal of Biotechnology*, 5 (19), 1700-1712.
- He, S.Y., Huang, H.-C., Collmer, A. (1993). *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* harpinPss: A protein that is secreted via the hrp pathway and elicits the hypersensitive response in plants. *Cell*, 73 (7), 1255-1266.
- Jiang, G.-F., Jiang, B.-L., Yang, M., Liu, S., Liu, J., Liang, X.-X., Bai, X.-F., Tang, D.-J., Lu, G.-T., He, Y.-Q., Yu, D.-Q., Tang, J.-L. (2013). Establishment of an inducing medium for type III effector secretion in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 44 (3), 945-952.
- Lei, Y., Guo, X., Liu, Y., Cao, Y., Deng, Y., Chen, X., Cheng, C.H.K., Dawid, I.B., Chen, Y., & Zhao, H. (2012). Efficient targeted gene disruption in *Xenopus* embryos using engineered transcription activator-like effector nucleases (TALENs). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109 (43), 17484-17489.
- Li, H.-Q., Sautter, C., Potrykus, I., Puonti-Kaerlas, J. (1996). Genetic transformation of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Nature Biotechnology*, 14 (6), 736-740.
- Li, T., Huang, S., Jiang, W.Z., Wright, D., Spalding, M.H., Weeks, D.P., Yang, B. (2010). TAL nucleases (TALENs): hybrid proteins composed of TAL effectors and FokI DNA-cleavage domain. *Nucleic Acids Research*, 39 (1), 359-372.
- Li, T., Liu, B., Spalding, M.H., Weeks, D.P., Yang, B. (2012). High-efficiency TALEN-based gene editing produces disease-resistant rice. *Nature Biotechnology*, 30 (5), 390-392.
- Li, Z., Zou, L., Ye, G., Xiong, L., Ji, Z., Zakria, M., Hong, N., Wang, G., Chen, G. (2014). A potential disease susceptibility gene CsLOB of citrus is targeted by a major virulence effector pthA of *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. *Molecular Plant*, 7 (5), 912-915.
- Lieber, M.R., Gu, J., Lu, H., Shimazaki, N., Tsai, A.G. (2009). Nonhomologous DNA end joining (NHEJ) and chromosomal translocations in humans. *Subcellular Biochemistry*, 279-296.
- Liu, J., Zheng, Q., Ma, Q., Gadidasu, K.K., Zhang, P. (2011). Cassava genetic transformation and its application in breeding. *Journal of Integrative Plant Biology*, 53 (7), 552-569.
- López, C.E., Bernal, A.J. (2012). Cassava bacterial blight: using genomics for the elucidation and management of an old problem. *Tropical Plant Biology*, 5 (1), 117-126.
- Ma, Q., Zhou, W., Zhang, P. (2015). Transition from somatic embryo to friable embryogenic callus in cassava: dynamic changes in cellular structure, physiological status, and gene expression profiles. *Frontiers in Plant Science*, 6.
- Miller, J.C., Tan, S., Qiao, G., Barlow, K.A., Wang, J., Xia, D.F., Meng, X., Paschon, D.E., Leung, E., Hinkley, S.J., Dulay, G.P., Hua, K.L., Ankoudinova, I., Cost, G.J., Urnov, F.D., Zhang, H.S., Holmes, M.C., Zhang, L., Gregory, P.D., Rebar, E.J. (2010). A TALE nuclease architecture for efficient genome editing. *Nature Biotechnology*, 29 (2), 143-148.
- Murashige, T., Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15 (3), 473-497.
- Park, C.-Y., Sung, J.J., Kim, D.-W. (2016). Genome editing of structural variations: modeling and gene correction. *Trends in Biotechnology*, 34 (7), 548-561.
- Sander, J.D., Cade, L., Khayter, C., Reyon, D., Peterson, R.T., Joung, J.K., Yeh, J.-R.J. (2011). Targeted gene disruption in somatic zebrafish cells using engineered TALENs. *Nature Biotechnology*, 29 (8), 697-698.
- Scholze, H., Boch, J. (2011). TAL effectors are remote controls for gene activation. *Current Opinion in Microbiology*, 14 (1), 47-53.
- Tampakaki, A.P., Skandalis, N., Gazi, A.D., Bastaki, M.N., Panagiotis, F.S., Charova, S.N., Kokkinidis, M., Panopoulos, N.J. (2010). Playing the "Harp": evolution of our understanding of hrp/hrc genes 1. *Annual Review of Phytopathology*, 48 (1), 347-370.
- Tang, X., Xiao, Y., Zhou, J.-M. (2006). Regulation of the type III secretion system in phytopathogenic bacteria. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 19 (11), 1159-1166.
- Taylor, N., Chavarriaga, P., Raemakers, K., Siritunga, D., Zhang, P. (2004). Development and application of transgenic technologies in cassava. *Plant Molecular Biology*, 56 (4), 671-688.
- Taylor, N., Gaitán-Solís, E., Moll, T., Trauterman, B., Jones, T., Pranjali, A., Trembley, C., Abernathy, V., Corbin, D., Fauquet, C.M. (2012). A high-throughput platform for the production and analysis of transgenic cassava (*Manihot esculenta*) plants. *Tropical Plant Biology*, 5 (1), 127-139.
- Taylor, N.J., Edwards, M., Kiernan, R.J., Davey, C.D.M., Blakesley, D., Henshaw, G.G. (1996). Development of friable embryogenic callus and embryogenic suspension culture systems in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Nature Biotechnology*, 14 (6), 726-730.
- Tesson, L., Usal, C., Ménoret, S., Leung, E., Niles, B.J., Remy, S., Santiago, Y., Vincent, A.I., Meng, X., Zhang, L., Gregory, P.D., Anegón, I., Cost, G.J. (2011). Knockout rats generated by embryo microinjection of TALENs. *Nature Biotechnology*, 29 (8), 695-696.
- Wei, Z., Laby, R., Zumoff, C., Bauer, D., He, S., Collmer, A., Beer, S. (1992). Harpin, elicitor of the hypersensitive response produced by the plant pathogen *Erwinia amylovora*. *Science*, 257 (5066), 85-88.